



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Genética de poblaciones de *Dactylonectria torresensis* aislado en vid, suelo y malas hierbas

Autor/es

LUIS ALBERTO CEDEÑO MACÍAS

Director/es

DAVID GRAMAJE PÉREZ y MARÍA FERNANDA RUIZ LARREA ,

Facultad

Escuela de Máster y Doctorado de la Universidad de La Rioja

Titulación

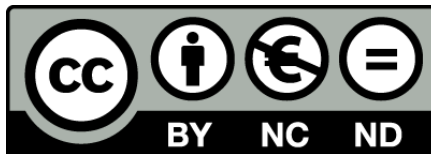
Máster Universitario en Química y Biotecnología

Departamento

AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

Curso académico

2017-18



Genética de poblaciones de *Dactylonectria torresensis* aislado en vid, suelo y malas hierbas, de LUIS ALBERTO CEDEÑO MACÍAS

(publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.

Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

© El autor, 2018

© Universidad de La Rioja, 2018

publicaciones.unirioja.es

E-mail: publicaciones@unirioja.es

Trabajo Fin de Máster

Genética de poblaciones de *Dactylonectria torresensis* en vid, suelo y malas hierbas

Autor:

Luis Alberto Cedeño Macias

MÁSTER:

Máster en Química y Biotecnología

Tutores:

David Gramaje Pérez

María Fernanda Ruíz Larrea

Escuela de Máster y Doctorado



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**

AÑO ACADÉMICO:

2018-2019

AGRADECIMIENTO

Agradezco al Gobierno y a la Universidad de la Rioja por brindarme la beca para seguir continuando mis estudios. A mis tutores por brindarme su apoyo durante este proceso. Agradezco al Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV) por hacerme participe en su centro, al grupo BIOVITIS (Marcos, Mercedes, Rebeca y Sonia), por ayudarme en todo momento y, en especial a Carmen Berlanas que me ha dedicado parte de su valioso tiempo y paciencia para seguir mejorando y poder culminar este trabajo. ¡Eres lo máximo, Carmen!

RESUMEN

Este Trabajo Fin de Máster (TFM) tiene como objetivo evaluar la diversidad genética de la especie fúngica *Dactylonectria torresensis* aislado en plantas de vid asintomáticas, suelo y malas hierbas en distintas parcelas de vivero y planta joven de vid. *D. torresensis* es el principal agente causal de la enfermedad del pie negro de la vid en España. Para este TFM se obtuvieron y analizaron 213 aislados de *D. torresensis*, procedentes de plantas de vid (199 aislados), de malas hierbas (4 aislados) y de suelo (10 aislados). Para evaluar la diversidad poblacional de *D. torresensis* se secuenció una región parcial del gen de la histona. Los resultados obtenidos en el análisis filogenético revelaron 12 haplotipos en las poblaciones de *D. torresensis*, siendo el haplotipo 1 (H1) el más abundante en las parcelas de viveros de Larraga y Mendavia, seguido de los haplotipos H2, H3 y H4. El árbol filogenético formó dos clados, con uno más numeroso compuesto por 8 de los 12 haplotipos, y se observó que todos los aislados obtenidos en planta, suelo y malas hierbas estaban estrechamente relacionados. Además, no hubo diferencias significativas en cuanto a la distribución de haplotipos de las parcelas de Larraga y Mendavia. En este TFM, se ha demostrado que *D. torresensis* puede vivir de forma endófito y sin causar síntomas de la enfermedad en plantas de vid, y tiene la capacidad de residir en suelo y otros huéspedes, como las malas hierbas. En trabajos futuros de investigación, sería necesario evaluar la virulencia de cada uno de los haplotipos en vid.

Palabras claves: *Dactylonectria torresensis*, pie negro, diversidad genética, planta de vid

ABSTRACT

The purpose of this master's degree project (TFM) is to evaluate the genetic diversity of *Dactylonectria torresensis* isolated from asymptomatic grapevines, soil and weeds in field nurseries and in a young vineyard. *D. torresensis* is the most common fungal species associated with black-foot disease of grapevine in Spain. In this TFM, 213 *D. torresensis* isolates were obtained from grapevines (199 isolates), weeds (4 isolates) and soil (10 isolates). To evaluate the population diversity of *D. torresensis*, a partial region of the histone gene was sequenced. The results obtained in the phylogenetic analysis revealed 12 haplotypes in the populations of *D. torresensis*, being the haplotype 1 (H1) the most abundant in the field nursery plots (Larraga and Mendavia), followed by the haplotypes H2, H3 and H4. The phylogenetic tree formed two clades, one of them composed by 8 of the 12 haplotypes. All isolates obtained in plant, soil and weeds were closely related. In addition, there were no significant differences in the haplotype distribution of Larraga and Mendavia plots. Results of this TFM demonstrated that *D. torresensis* is able to live endophytally in grapevine and has the capacity to be inhabitant of soil and other alternative hosts such as weeds. Further research is needed to evaluate the virulence of each of the haplotypes on grapevine.

Keywords: *Dactylonectria torresensis*, Black-foot disease, genetic diversity, grapevine

ÍNDICE

RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Las enfermedades fúngicas de la madera de la vid	1
1.2.- El pie negro de la vid	5
1.2.1.- <i>Sintomatología</i>	5
1.2.2.- <i>Etiología y taxonomía</i>	6
1.2.3.- <i>Biología y epidemiología</i>	8
1.3.- Medidas de control.....	9
2.- OBJETIVOS	10
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1.- Aislados fúngicos.....	11
3.2.- Procesado de muestras.....	11
3.3.- Aislamiento de hongos del material vegetal.....	12
3.4.- Aislamiento de hongos del suelo	12
3.5.- Identificación fúngica	13
3.6.- Análisis de datos	14
4.1.- Aislamiento fúngico	16
4.2.- Análisis filogenético.....	16
5.- DISCUSIÓN	20
6.- CONCLUSIONES	25
7.- BIBLIOGRAFÍA	26
ANEXOS	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Número de muestras obtenidas en las distintas parcelas objeto de estudio.....	11
Tabla 3.2 Secuencias de los cebadores usados en la PCR.	14
Tabla 4.1 Número de aislados de <i>D. torresensis</i> obtenidos de las muestras objeto de estudio	16
Tabla 4.2 Haplotipos y SNPs encontrados en todos los aislados estudiados (planta injerto, malas hierbas y suelo).....	17
Tabla 4.3 Abundancia de cada uno de los haplotipos encontrados en las parcelas de Larraga y de Mendavia estudiadas	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Síntomas de decaimiento en plantas jóvenes de vid; cortes transversales (b) y longitudinales (c) de un portainjerto joven de vid mostrando necrosis xilemática; d) corte transversal de una planta joven de vid afectada por la enfermedad de Petri. 4

Figura 1.2 a) Síntoma en campo del decaimiento por *Botyrosphaeria*: desecación de sarmientos y muerte del brazo; b) necrosis sectoriales en la madera que toman color marrón oscuro y consistencia dura; c) síntomas externos de yesca asociados a la forma lenta o crónica: coloraciones internerviales en hojas que toman progresivamente una coloración rojiza en las de uva tinta; síntomas de yesca en madera de vid: punteaduras necróticas en el xilema (d) y podredumbre esponjosa de color blanco–amarillento (e); f) síntomas externos de yesca asociados a la forma rápida o apopléjica: muerte repentina de la planta; g) y h) síntomas externo de eutipiosis: brotes débiles, con entrenudos cortos, hojas más pequeñas y algo deformadas, cloróticas y con necrosis, generalmente marginales..... 5

Figura 1.3 Corte transversal (a) y longitudinal (b) de una planta joven de vid afectada por pie negro; c) la afección por hongos causantes del pie negro suele venir asociada a una deformación de la raíz. 6

Figura 4.1 Distribución de los haplotipos en ambas parcelas..... 19

Figura 4.2 Árbol filogenético construido a partir de las secuencias haplotípicas. Los símbolos en la gráfica representan: P=Planta; S=Suelo; MH= Malas hierbas con su respectivo número de aislados..... 19

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Las enfermedades fúngicas de la madera de la vid

Las amenazas a las que están expuestos los viñedos comerciales engloban hasta 20 tipos de plagas potenciales, diversas enfermedades y malas hierbas (Magrama, 2017). De entre ellas, en la actualidad, las enfermedades fúngicas de la madera de la vid (EFMV) son unos de los problemas más graves del cultivo (Luque et al., 2014). Por tanto, dado el impacto del cultivo tanto en el sector agrícola como en el ámbito económico del mundo, y de La Rioja en particular, el sector vitivinícola demanda alternativas para controlar su expansión y, de esta manera, aumentar la vida productiva de los viñedos implantados.

Las EFMV se encuentran entre las patologías más dañinas que afectan al cultivo de la vid. Las EFMV engloban toda una serie de patologías que causan necrosis y/o podredumbres internas de la madera, empobreciendo el vigor del producto y reduciendo la cantidad y calidad de la cosecha (Bertsch et al., 2013). Estas enfermedades están causadas por una serie de hongos fitopatógenos que pueden causar infecciones conjuntas en las plantas y cuya sintomatología es diversa (Figuras 1.1 y 1.2).

Según estimaciones recientes, el coste anual de replante de vid en el mundo debido a las EFMV asciende a 1.132 millones de euros (Hofstetter et al., 2012). En Francia, se estima que aproximadamente un 12% de los viñedos son improductivos debido a las EFMV, causando unas pérdidas anuales de 1 billón de euros (Lorch, 2014). En España se estima una media del 3% de plantas afectadas por EFMV, aunque existen plantaciones recién establecidas en las que su incidencia podría superar el 20%, generando pérdidas económicas anuales muy elevadas (Fontaine & Armengol, 2014).

Tradicionalmente, estas enfermedades se han asociado a viña adulta. La yesca y la eutipiosis eran bien conocidas por los viticultores y su control se realizaba principalmente mediante la aplicación de arsenito sódico y podas sanitarias para eliminar madera muerta. Sin embargo, a partir de la década de los años 90, coincidiendo con el establecimiento de numerosas plantaciones nuevas, se comenzó a detectar en diferentes regiones del mundo, incluida

España, un aumento en el decaimiento y muerte progresiva de plantas jóvenes ya desde el primer año de la plantación. Este fenómeno también se observó durante el proceso de producción de planta injertada en los viveros. En la madera de las plantas afectadas se aislaron diferentes especies de hongos que no se correspondían con los asociados tradicionalmente a las EFMV. Esta situación provocó un renovado interés en el estudio de estas enfermedades, impulsando el desarrollo de nuevas líneas de investigación en todo el mundo (Gramaje & Armengol, 2011).

Actualmente, las enfermedades que presentan una mayor incidencia en planta joven en España son la enfermedad de Petri, el pie negro de la vid y el decaimiento por *Botryosphaeria*. Esta última enfermedad también puede afectar a vides adultas, junto con la yesca y la eutipiosis. A continuación, se detallan cada una de ellas por separado, con excepción del pie negro de la vid, a la que se le dedicará un apartado diferente por ser el tema de estudio del presente Trabajo Fin de Máster (TFM).

Los síntomas en campo de la enfermedad de Petri y el pie negro son difíciles de distinguir. En los primeros años tras la plantación se observa retraso en la brotación, escaso desarrollo, achaparramiento, entrenudos cortos, clorosis y amarilleamiento (Figura 1.1a).

La **enfermedad de Petri** está causada por hongos pertenecientes al género *Phaeoacremonium*, y las especies *Phaeomoniella chlamydospora* y *Cadophora luteo-olivacea*. Afectan principalmente a la parte basal del patrón, colonizando los tejidos xilemáticos, de modo que al realizar cortes transversales y longitudinales de la madera se observan pequeñas punteaduras o estrías necróticas, respectivamente, correspondientes a los vasos afectados por la enfermedad, observándose en ocasiones exudaciones gomosas (Figura 1.1b, 1.1c y 1.1d).

La enfermedad del **decaimiento por *Botryosphaeria***, causada por 26 especies de la familia Botryosphaeriaceae, se caracteriza por producir necrosis sectoriales de la madera de los brazos o del tronco principal de las plantas que causan su desecación y muerte (Figura 1.2a y b).

La **yesca** está causada por los hongos *Phaeomoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium* spp., y por varios hongos basidiomicetos, siendo el más frecuente *Fomitiporia mediterranea*. Esta enfermedad puede presentarse externamente bajo dos formas según su evolución: lenta y rápida o apopléjica (Gramaje et al., 2018). En la primera, las hojas muestran coloraciones en las zonas internerviales, que posteriormente evolucionan a necrosis (Figura 1.2c). La producción se reduce y los racimos incluso llegan a pasificarse prematuramente. Estos síntomas pueden manifestarse de forma crónica en algunas plantas y de forma totalmente errática en otras, de manera que aquéllos se desarrollan un año, pero no el siguiente. En la forma apopléjica, que se da sobre todo en verano, se produce la muerte repentina de la planta (Figura 1.2f). Las secciones transversales de los troncos afectados muestran una variedad de síntomas internos de la madera, como estrías necróticas en el xilema, a veces rodeadas por una decoloración de la madera de color rosa a marrón (Figura 1.2d). En estados avanzados de la enfermedad, suele observarse una podredumbre seca y esponjosa de la madera en las zonas centrales del tronco y/o brazos (Figura 1.2e).



Figura 1.1 Síntomas de decaimiento en plantas jóvenes de vid; cortes transversales (b) y longitudinales (c) de un portainjerto joven de vid mostrando necrosis xilemática; d) corte transversal de una planta joven de vid afectada por la enfermedad de Petri.

La **eutipiosis**, causada por el ascomiceto *Eutypa lata* y otros 23 hongos diatrypáceos, se caracteriza por una necrosis sectorial de color marrón oscuro en las secciones transversales de la madera. Las plantas afectadas desarrollan brotes débiles, con entrenudos cortos, hojas más pequeñas algo deformadas, cloróticas y con necrosis generalmente marginal (Figura 1.2g y h). Los síntomas foliares pueden aparecer de 3 a 8 años después de la infección y variar de un año a otro. Los racimos maduran de manera desigual, son pequeños, y en casos severos, los frutos se pasifican y mueren.

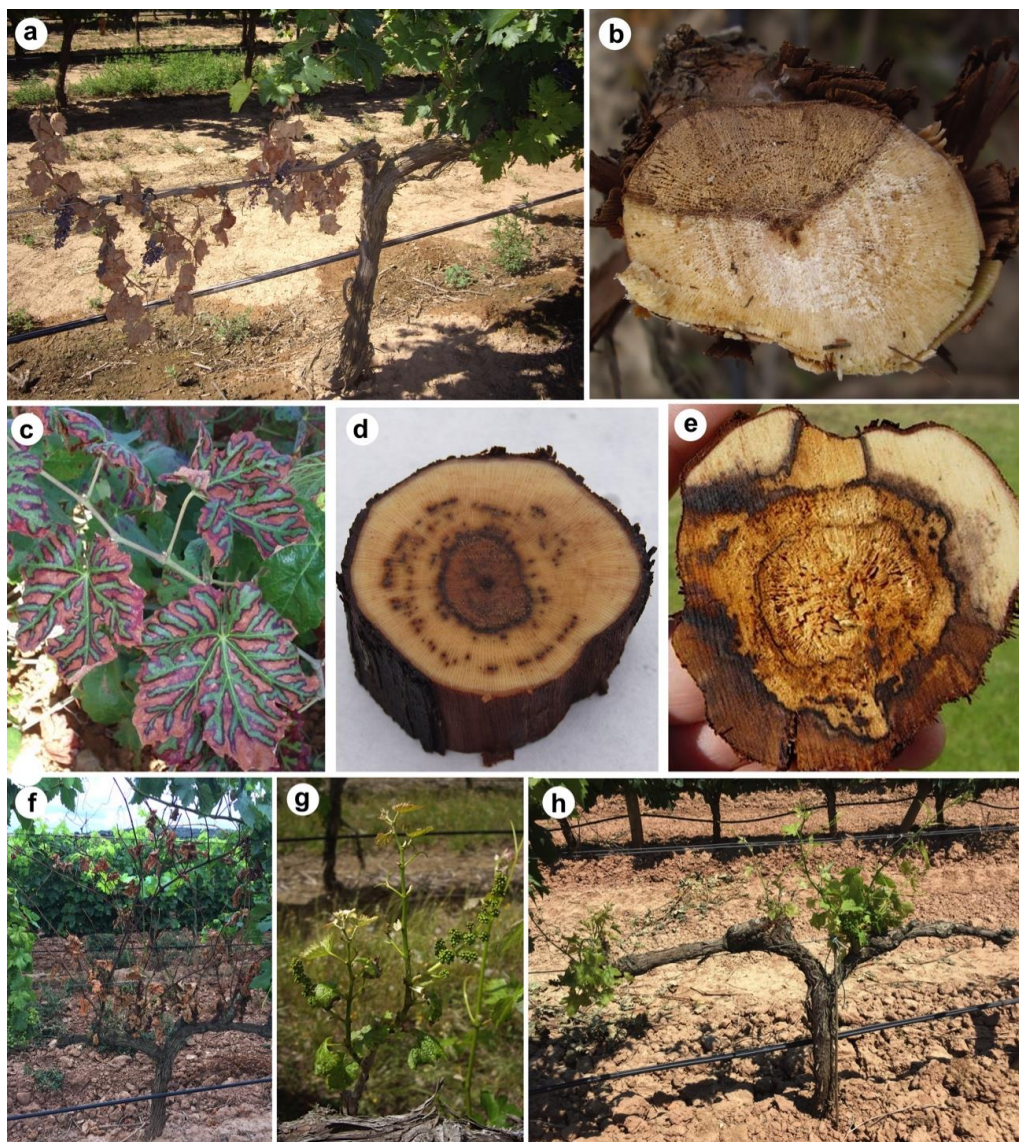


Figura 1.2 a) Síntoma en campo del decaimiento por *Botyrosphaeria*: desecación de sarmientos y muerte del brazo; b) necrosis sectoriales en la madera que toman color marrón oscuro y consistencia dura; c) síntomas externos de yesca asociados a la forma lenta o crónica: coloraciones internerviales en hojas que toman progresivamente una coloración rojiza en las de uva tinta; síntomas de yesca en madera de vid: punteaduras necróticas en el xilema (d) y podredumbre esponjosa de color blanco–amarillento (e); f) síntomas externos de yesca asociados a la forma rápida o apopléjica: muerte repentina de la planta; g) y h) síntomas externo de eutipiosis: brotes débiles, con entrenudos cortos, hojas más pequeñas y algo deformadas, cloróticas y con necrosis, generalmente marginales

1.2.- El pie negro de la vid

1.2.1.- *Sintomatología*

Durante la primavera, las plantas de vid afectadas por el pie negro presentan un retraso en su desarrollo, con una vegetación débil, hojas cloróticas y achaparradas por la falta de agua y entrenudos más cortos (Hallen et al., 2006). En ocasiones, algunas yemas o la planta entera no llegan ni a brotar. Estos síntomas aéreos son consecuencia de los daños sufridos en las raíces y cuello de la planta, que es dónde ocurre la infección. Asimismo, estos síntomas son muy generales y pueden fácilmente confundirse con los producidos por la enfermedad de Petri (Figura 1.1a).

Las raíces de las plantas afectadas presentan lesiones oscuras, necróticas y deprimidas con la consiguiente reducción de la barbada. En ocasiones, para compensar esta pérdida de masa radicular, algunas plantas desarrollan una nueva emisión de raíces, normalmente por encima de la zona afectada, quedando más cercana a la superficie del suelo. En la madera del portainjerto se observan coloraciones oscuras y necrosis que se inician desde la base del mismo y se extienden hacia arriba. En cortes transversales, estas lesiones necróticas pueden ir desde la corteza hasta la médula (Figura 1.3a y b). En ocasiones, la afección por hongos causantes del pie negro viene asociada a

una deformación de la raíz causada en el momento de la plantación (Figura 1.3c).

Estos síntomas pueden, finalmente, conducir a la muerte de la planta en la misma campaña o en las campañas siguientes, ocurriendo más rápidamente cuanto más joven es la planta afectada (Grasso, 1984; Maluta & Larignon, 1991; Rego et al., 2000; Halleen et al., 2004; Halleen et al., 2006). Las coloraciones oscuras y necrosis, principalmente en la base del portainjerto, son las que han dado a la enfermedad el nombre de pie negro (Grasso & Magnano Di San Lio, 1975; Maluta & Larignon, 1991).

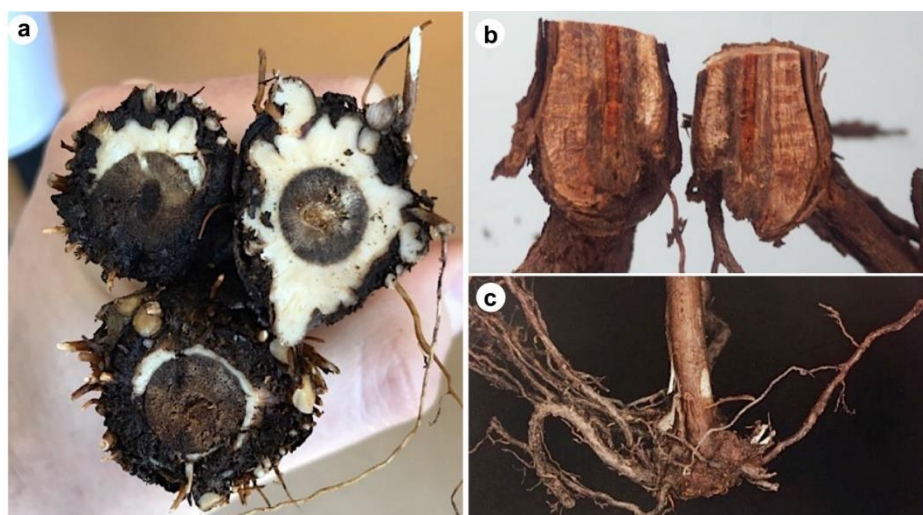


Figura 1.3 Corte transversal (a) y longitudinal (b) de una planta joven de vid afectada por pie negro; c) la afección por hongos causantes del pie negro suele venir asociada a una deformación de la raíz.

1.2.2.- Etiología y taxonomía

Varias especies de hongos pertenecientes a los géneros *Campylocarpon*, *Cylindrocladiella*, *Dactylonectria*, *Ilyonectria*, *Neonectria* y *Thelonectria* han sido asociadas a la enfermedad del pie negro (Agustí-Brisach & Armengol, 2013; Lombard et al., 2014; Carlucci et al., 2017), siendo *Dactylonectria torresensis* la especie más frecuente aislada de vides con síntomas de la enfermedad en España (Berlanas et al., 2017), Italia (Carlucci et al., 2017) y Portugal (Reis et al., 2013).

El género "*Cylindrocarpon*" fue descrito por primera vez en 1913 por Wollenweber (Agustí-Brisach & Armengol, 2013). En 1966 Booth dividió el género "*Cylindrocarpon*" en cuatro grupos basándose en la presencia o ausencia de microconidias y clamidosporas (Lombard et al., 2014). Tradicionalmente el pie negro de la vid ha sido asociado a dos especies del género "*Cylindrocarpon*": "*C. destructans*" y "*C. obtusisporium*" (Abreo et al., 2010). "*C. destructans*" fue descrita por primera vez afectando a vid en Francia en el año 1961 (Halleen et al., 2006), desde entonces, se ha identificado en Italia, Portugal, Argentina, Alemania, Nueva Zelanda, Sudáfrica, Brasil y California. Paralelamente, se citó la presencia de "*C. obtusisporium*" en Sicilia y luego en California (Agustí-Brisach & Armengol, 2013).

En el año 2004 fue descrita una nueva especie, "*C. macrodidymum*", como agente causal de la enfermedad (Halleen et al., 2004). En este mismo año también se describió un nuevo género asociado al pie negro, denominado *Campylocarpon*, en el que se incluyeron dos especies: *Campylocarpon fasciculare* y *Ca. pseudofasciculare* (Agustí-Brisach & Armengol, 2014).

En 2006 los resultados de un trabajo donde se compararon aislados de "*C. destructans*" con otras especies de este género, revelaron que los aislados de "*C. destructans*" procedentes de vid presentaban secuencias idénticas a la especie "*C. liriodendri*", para los genes estudiados. Como consecuencia todos los aislados de "*C. destructans*" obtenidos de viña, fueron renombrados como "*C. liriodendri*" (Halleen et al., 2006).

En 2011, Chaverri et al., llevaron a cabo un estudio filogenético de *Neonectria*, "*Cylindrocarpon*" y las formas asexuales de "*Cylindrocarpon*". Como consecuencia de los resultados de este estudio, el género *Neonectria* quedó dividido en 5 grupos: *Neonectria*/*Cylindrocarpon*", *Rugonectria*, *Thelonectria*, *Ilyonectria* y los anamorfos del género *Campylocarpon*. Tras esta reclasificación, las especies "*C. liriodendri*" y "*C. macrodidymum*" fueron incluidas dentro del género *Ilyonectria* y pasaron a denominarse como *I. liriodendri* e *I. macrodidyma*.

En 2012, análisis moleculares de diversos genes como el gen de la histona H3 o el gen de la β -tubulina, permitieron identificar varias especies nuevas

dentro del género *Ilyonectria*, asociadas a la enfermedad del pie negro (Cabral et al., 2012). En 2014 un nuevo análisis multigenético de distintos aislados permitió identificar un nuevo grupo, *Dactylonectria*, que incluye especies previamente clasificadas dentro de *Ilyonectria* (Lombard et al., 2014). Otro género que también se ha asociado al pie negro de la vid es *Cylindrocladiella*, destacando dos especies: *Cylindrocladiella parva* y *Cyl. peruviana* (Agustí-Brisach & Armengol, 2014).

Por todo esto se puede afirmar que los agentes causales de la enfermedad del pie negro son múltiples y diversos, y están en continua reevaluación taxonómica. Gracias a las técnicas moleculares se están identificando un número considerable de nuevas especies asociadas a esta patología, ya que la mayoría de ellas son indistinguibles sólo mediante la consideración de sus características fenotípicas.

1.2.3.- Biología y epidemiología

Los hongos causantes del pie negro son capaces de infectar a las plantas a través de heridas en las raíces o en la parte basal del patrón que está en contacto con el suelo (Agustí-Brisach et al., 2014). Estos hongos son habitantes comunes del suelo y se han realizado estudios que han demostrado que estos hongos están presentes en suelos de campos de vivero y también en viñedos comerciales (Agustí-Brisach et al., 2013; Berlanas et al. 2017). Es más, algunos de ellos producen estructuras de resistencia (clamidoporas) que les permiten sobrevivir durante largo tiempo en ausencia de hospedante. Por ello la fase de enraizamiento en los campos de vivero, así como el establecimiento de nuevas plantaciones, se consideran momentos críticos para la infección de plantas (Agustí-Brisach & Armengol, 2014). También se ha demostrado que las plantas madre podrían proporcionar el material vegetal de base infectado. Además, los plantones pueden infectarse durante el proceso de producción de planta injertada, debido a las heridas que se producen en algunas fases del mismo (Gramaje & Armengol, 2011).

Además de plantas de vivero y plantaciones jóvenes de vid, las especies asociadas al pie negro también pueden afectar gravemente a semilleros

forestales, especialmente de coníferas, generando importantes pérdidas de plantas (Hamelin et al., 1996; Mora-Sala et al., 2018). Otro cultivo que puede ser gravemente dañado es el ginseng (*Panax quinquefolius* L.), en el que la especie "*C. destructans*" causa severas podredumbres de raíz en plántulas y plantas adultas (Reeleder & Brammal, 1994; Mahfusur et al., 2005). Un estudio posterior ha demostrado que varias especies fúngicas asociadas al pie negro pueden sobrevivir en huéspedes alternativos como malas hierbas (Agustí-Brisach et al., 2011).

1.3.- Medidas de control

Hasta la fecha, las medidas que se han desarrollado para el control del pie negro de la vid se basan principalmente en medidas culturales: utilización de material vegetal sano y prevención o corrección de las condiciones que puedan causar estrés en las plantas durante los primeros estados de crecimiento y que podrían favorecer el desarrollo de la enfermedad (riegos excesivos o periodos extensos sin agua, etc.) (Halleen et al., 2006). Estas medidas contribuyen a que las plantas permanezcan libres de estos hongos durante un período de tiempo más prolongado. Asimismo, las investigaciones que se están desarrollando actualmente, debido a la reducción en el uso de productos químicos en la Unión Europea, están enfocadas principalmente al saneamiento de las plantas en la etapa de vivero mediante medidas de control físico (termoterapia con agua caliente) (Fourie & Halleen, 2004), biológico (Fourie & Halleen, 2006) o mediante la fumigación del suelo con plantas biocidas (Berlanas et al., 2018).

2.- OBJETIVOS

El objetivo principal de este TFM es evaluar la diversidad poblacional de la especie fúngica *Dactylonectria torresensis*, aislado de planta de vid, suelo y malas hierbas. A continuación, se enumeran los objetivos específicos del presente trabajo:

- Determinar la presencia de *Dactylonectria torresensis* en campos de cultivo de vid en Larraga y Mendavia (Navarra), y en Logroño (La Rioja).
- Evaluar el papel de las malas hierbas y el suelo como fuentes potenciales de inóculo de la especie fúngica *D. torresensis*.
- Analizar y comparar la distribución de los haplotipos encontrados en los distintos huéspedes y campos objeto de estudio.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Aislados fúngicos

En este estudio se utilizaron 213 aislados de *Dactylonectria torresensis* procedentes de dos campos de vivero (199 aislados), malas hierbas (4 aislados) y suelo (10 aislados). La planta injertada procedente de los campos de vivero no presentaba síntomas foliares ni radiculares asociados al pie negro. Los campos de vivero se localizaron en Larraga, Navarra (42.520565, -1.814855) y Mendavia, Navarra (42.467242, -2.241254). En ambas parcelas se colectaron muestras de suelo. Además, se colectaron malas hierbas de la parcela de Larraga y de un viñedo joven localizado en Logroño, La Rioja (42.464995, -2.291863).

Tabla 3.1. Número de muestras obtenidas en las distintas parcelas objeto de estudio.

Parcelas	nº de muestras		
	Plantas	Suelo	Malas hierbas
Vivero de Larraga	240	4	17
Vivero de Mendavia	280	4	-
Viñedo de La Rioja	-	-	47

3.2.- Procesado de muestras

En febrero del 2017 se seleccionaron 280 plantas en la parcela de Mendavia, y en marzo del 2018 un total de 240 plantas se seleccionaron en la parcela de Larraga, las cuales se arrancaron para su posterior análisis en el laboratorio (Tabla 3.1). La selección de las distintas especies de malas hierbas se realizó según las características morfológicas observadas en campo. En los meses de febrero y abril del 2018, se realizó un muestreo, obteniendo 17 malas hierbas en la parcela de Larraga y 47 en la parcela de Logroño (Tabla 3.1). Las malas hierbas se arrancaron cuidadosamente del suelo para mantener el sistema radicular intacto. Posteriormente, se usaron guías y claves taxonómicas en laboratorio para su identificación (Aizpuru et al., 1999). Para

las muestras de suelo, en la parcela de Larraga se marcó un área en forma de “V” que incluía cuatro espacios entre filas, de los cuales se tomaron cuatro muestras de suelo con una pala a una profundidad de 10-30 cm (0,5 kg de suelo por muestra). En la parcela de Mendavia, las cuatro muestras de suelo se tomaron aleatoriamente del espacio intermedio entre plantas, bajo los mismos parámetros mencionados anteriormente (Tabla 3.1). Todas las muestras se llevaron inmediatamente al laboratorio del grupo Interacciones de la Vid con el Medio Biológico (BIOVITIS) del Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino (ICVV) para su procesamiento.

3.3.- Aislamiento de hongos del material vegetal

Los aislamientos del material vegetal se realizaron de las raíces, ya que es la zona con mayor prevalencia de hongos asociados al pie negro. Inicialmente, las muestras se lavaron con agua del grifo para eliminar los restos del suelo, y luego se desinfectaron en un baño con 1:3 de hipoclorito sódico (1,5% de cloro activo) durante 1 min, seguidos de dos baños con agua estéril durante 1 min. A continuación, las raíces se secaron envolviéndolas con papel absorbente.

Para el aislamiento de los hongos asociados al pie negro se seleccionaron fragmentos de tejido asintomático de las raíces y se sembraron en medio MEA (33,6 g de agar extracto de malta; 1 litro de agua destilada) (Laboratorios Conda, Madrid) con la adición de 0,4 g de sulfato de estreptomicina (MEAS) (Biochemica, PanReac AppliChem). Las placas de aislamiento se incubaron en estufa a 25 °C en oscuridad durante 10 días. De las colonias se extrajeron puntas hifales que se replicaron en el medio PDA (39 g de patata-dextrosa-agar; 1 litro de agua destilada) (PDA European Pharmacopeia, USA, Conda) para su posterior identificación.

3.4.- Aislamiento de hongos del suelo

Las muestras de suelo se tamizaron manualmente sobre una malla de 4 milímetros, con el fin de remover las partículas grandes de suelo. A continuación, se diluyeron y homogenizaron 20 gramos de suelo en cuatro frascos erlenmeyer de 250 cc conteniendo 100 mL de agar agua al 0,1%

agitándose durante 10 min a 250 rpm. Posteriormente, se diluyeron alícuotas de 1 mL 100 veces en 100 mL de agar agua al 0,1%.

Finalmente, 150 µl de la dilución se sembró en placas Petri con medio de cultivo Agar Rosa de Bengala con Glucosa e infusión de Haba (GFBRBA) (Berlanas et al., 2017). Se usaron cinco placas por replicado, que se incubaron a 25°C en oscuridad durante 15 días. Las colonias emergentes se replicaron en medio PDA para su posterior identificación. Para cada muestra de suelo se prepararon un total de 60 placas.

3.5.- Identificación fúngica

La identificación morfológica de los aislados de hongos asociados a la enfermedad del pie negro se hizo a partir de las características de crecimiento de las colonias crecidas en PDA, y se observó el color, tipo, textura, forma del margen y abundancia del micelio (Cabral et al., 2012; Agustí-Brisach & Armengol, 2013). Para determinar la identidad de la especie *D. torresensis* se aplicaron técnicas de biología molecular. En primer lugar, el micelio fúngico de cultivos puros en placas de PDA de 2-3 semanas a 25°C fue retirado del medio de cultivo. El DNA genómico fue extraído utilizando el kit E.Z.N.A.® Plant DNA Miniprep (Omega Bio-tek, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para su cuantificación se utilizó un espectrofotómetro (NanoDrop one, Thermo Fisher scientific) y, posteriormente, el DNA fue almacenado a -20°C hasta su posterior amplificación.

Para este estudio, se amplificó una secuencia parcial del gen de la histona usando los cebadores CYLH3F y CYLH3R (Crous et al., 2004) (Tabla 3.2). Cada reacción en cadena de la polimerasa (PCR) estaba formada por 1 µL de cada cebador, 12.5 µL Taq Readymix (Fastgene, Nippon genetics Europe GmbH) que presentaba una composición: Taq buffer (1X), dNTPs (0.2 mM de cada dNTP a 1X), MgCl₂ (1.5 mM a 1X) y estabilizadores. A esta mezcla se le añadió 1 µL del DNA extraído, con volumen final de 25 µL conseguido mediante la adición de agua MilliQ estéril. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (T100 Thermal Cycler, Bio Rad), empleando el siguiente programa: un paso inicial de desnaturalización de 3 a 95 °C, seguido de 35 ciclos de amplificación con una desnaturalización a 95 °C durante 30 s,

anillamiento de 58 °C durante 30 s y elongación de 72 °C durante 1 min. Se realizó una extensión final de 72°C durante 1 min. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (Agarose D1 Low EEO, Conda, Madrid) preparado con buffer TAE 1X (1x solución contiene: 40 mM de Tris, 20 mM de ácido acético y 1 mM de EDTA, pH 8.3) teñidos con ReadSafe. Los tamaños de los fragmentos de DNA se estimaron mediante el marcador 100 bp Molecular Ruler DNA Size Standard, Bio-Rad laboratorios S.A. Los fragmentos de DNA separados en los geles se visualizaron bajo la exposición de luz ultravioleta y se fotografiaron empleando el programa ChemiDoc XRS (Molecular Imagen, Bio Rad).

Tabla 3.2 Secuencias de los cebadores usados en la PCR.

Cebador	Secuencia
CYLH3F	AGGTCCACTGGTGGCAAG
CYLH3R	AGCTGGATGTCCTTGGACTG

3.6.- Análisis de datos

Los productos de PCR se enviaron a Macrogen (Macrogen, Madrid, España) para su secuenciación. Las secuencias se editaron eliminando los extremos y corrigiendo los posibles errores de secuenciación empleando el programa MEGA v6 (Tamura et al., 2011). Después, se realizó un alineamiento múltiple con todos los aislados obtenidos y se comparó con secuencias de referencia de especies asociadas a la enfermedad del pie negro obtenidas de la base de datos del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) a través de un análisis filogenético. Aquellos aislados identificados como *D. torresensis*, se secuenciaron nuevamente en la otra dirección del amplicón para obtener la secuencia consenso de cada aislado. Los aislados pertenecientes a otras especies se excluyeron del análisis posterior.

Con las secuencias consenso de todos los aislados de *D. torresensis*, se realizó un nuevo alineamiento con la finalidad de observar las diferencias haplotípicas entre ellos. Posteriormente, para estudiar la relación entre aislados de cada grupo poblacional de *D. torresensis* en suelo, malas hierbas y vid se

construyó un árbol filogenético. El árbol se realizó empleando la estimación de máxima verisimilitud, bajo el mejor modelo determinado por el propio programa, y se evaluó la robustez estadística del mismo mediante un *bootstrapping* con 1000 repeticiones.

Todas las ediciones, alineamientos y el árbol filogenético se realizaron con el programa informático de Análisis Genético de Evolución Molecular, versión 6 (MEGA) (Tamura et al., 2011).

4.- RESULTADOS

4.1.- Aislamiento fúngico

La especie fúngica asociada al pie negro, *Dactylonectria torresensis*, se aisló con éxito del material vegetal y de las muestras de suelo en los distintos campos objeto de estudio. En la Tabla 4.1 se muestran los aislados obtenidos del muestreo realizado. Del total de 520 plantas seleccionadas entre ambas parcelas, se obtuvieron 199 aislados fúngicos (100 en la parcela de Mendavia y 99 en la parcela de Larraga). Además, de las cuatro muestras de suelo se obtuvieron seis y cuatro aislados, pertenecientes a las parcelas de Mendavia y Larraga, respectivamente. De las 64 malas hierbas recogidas en la parcela de Larraga y Logroño, solo se obtuvieron cuatro aislados en la parcela de Larraga. Los géneros de malas hierbas de los que se aisló *D. torresensis* fueron *Stellaria* (2 aislados), que pertenece a la familia *Caryophyllaceae*, y *Capsella* (2 aislados), de la familia *Brassicaceae*.

Tabla 4.1 Número de aislados de *D. torresensis* obtenidos de las muestras objeto de estudio.

Parcelas	nº de muestras			nº de aislados
	Plantas	Suelo	Malas hierbas	
Vivero de Larraga	240	4	17	99
				4
				4
Vivero de Mendavia	280	4		100
				6
Viñedo de la Rioja			47	0
Total	520	8	64	213

4.2.- Análisis filogenético

Al secuenciar un fragmento de 500 pb del gen de la histona (ver anexo) se encontraron 12 haplotipos (H) distintos, con ocho sitios polimórficos y SNPs (polimorfismo de un solo nucleótido), entre los 213 aislados considerados en este estudio (Tabla 4.2). En la Tabla 4.2 se muestra que el haplotipo 1 (H1) fue el más frecuente, estando presente en la parcela de Larraga en plantas (75 aislados), suelo (3 aislados) y malas hierbas (4 aislados), mientras que en la parcela de Mendavia se detectó en plantas (59 aislados) y suelo (1 aislado).

Los haplotipos H2, H3 y H4 siguen al H1 en frecuencia y se encontraron en las parcelas de Larraga y Mendavia, tanto aislados de muestras de plantas como de suelo. El haplotipo 5 (H5), sólo se encontró en la parcela de Mendavia en plantas (6 aislados). Los haplotipos H6, H7, H8, H9, H10 y H11 se aislaron de plantas en la parcela de Mendavia, todos con un único representante. Por último, el haplotipo 12 (H12) correspondió a un solo aislado detectado en una planta de la parcela de Larraga. Tal y como se ha mencionado en el apartado de Materiales y Métodos (sección 3.6) las secuencias obtenidas en este trabajo se compararon con las secuencias de referencia de la especie *D. torresensis* depositadas en la base de datos del NCBI (Números de acceso: JF735660.1 y KX778707.1) para determinar si los haplotipos se habían encontrado en muestras anteriores, y se evidenció que el H2 coincidía con una similitud del 100% con las secuencias de referencia.

Tabla 4.2 Haplotipos y SNPs encontrados en todos los aislados estudiados (planta injerto, malas hierbas y suelo).

Haplotipos (H)	Individuos	Posición del SNP							
		BASE							
		2	19	56	119	191	204	221	299
1	141	G	T	C	C	T	C	T	G
2*	22	T	T	C	C	T	C	T	G
3	23	T	T	T	C	T	C	C	G
4	14	T	C	C	C	T	C	T	G
5	6	T	C	T	C	T	T	T	A
6	1	T	C	C	C	T	T	T	A
7	1	T	T	T	C	C	C	C	G
8	1	T	C	T	C	T	T	T	G
9	1	G	C	C	C	T	C	T	G
10	1	T	T	T	C	T	C	T	G
11	1	T	T	T	T	T	C	T	G
12	1	T	T	C	C	T	C	C	G
TOT	213								

* Haplotipo de las secuencias de referencia JF735660.1 y KX778707.1

La proporción de cada haplotipo en las dos parcelas objeto de estudio se muestra en la Figura 4.1 y Tabla 4.3. De los 12 haplotipos, 11 se encontraron en la parcela de Mendavia y cinco en la parcela de Larraga. La abundancia de aislados en tres haplotipos (H1, H2, y H4) compartidos por ambos campos fue

similar ($p>0.05$), mientras que el H3 se encontró más abundante en la parcela de Mendavia ($p<0.0004$).

En la Figura 4.2 se muestra el árbol filogenético desarrollado a partir de un representante de cada haplotipo. El árbol resultante reveló un clado más numeroso, que integraba ocho de los 12 haplotipos (valor de bootstrap 28%), mientras que en el otro grupo se compuso por cuatro haplotipos con un valor del 28%.

Tabla 4.3 Abundancia de cada uno de los haplotipos encontrados en las parcelas de Larraga y de Mendavia estudiadas

Haplotipos (H)	Parcelas	
	Mendavia	Larraga
	Abundancia (%)	
1	56.6	75.7
2	8.5	12.1
3	18.9	2.8
4	4.7	8.4
5	5.7	0.0
6	0.9	0.0
7	0.9	0.0
8	0.9	0.0
9	0.9	0.0
10	0.9	0.0
11	0.9	0.0
12	0.0	0.9

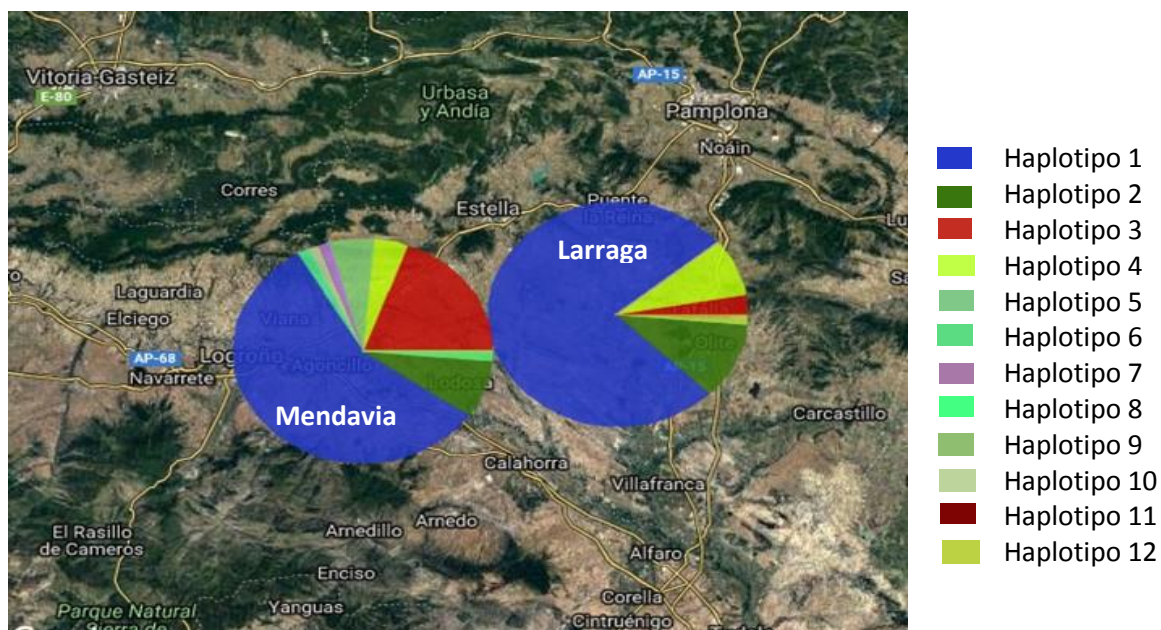


Figura 4.1 Distribución de los haplotipos en ambas parcelas.

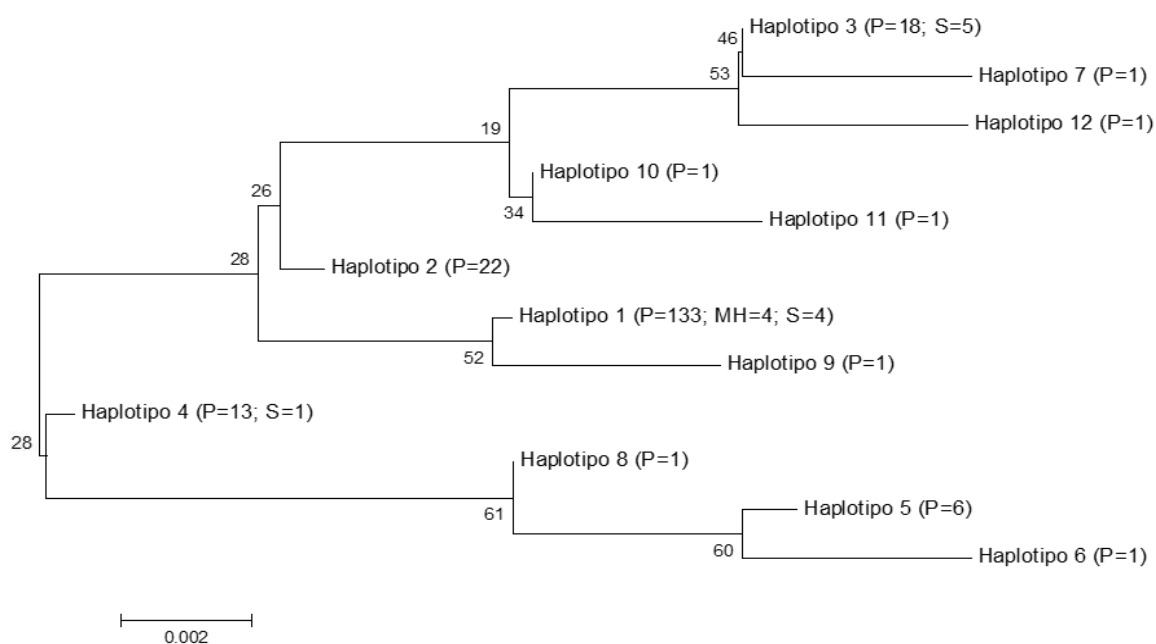


Figura 4.2 Árbol filogenético construido a partir de las secuencias haplotípicas. Los símbolos en la gráfica representan: P=Planta; S=Suelo; MH= Malas hierbas con su respectivo número de aislados.

5.- DISCUSIÓN

De las 520 plantas de vid asintomáticas procedentes de las parcelas de Larraga y Mendavia que fueron analizadas, se obtuvieron 199 aislados endófitos de la especie fúngica *D. torresensis*. Estudios previos recogidos en la bibliografía ya habían mostrado que la vid tiene la capacidad de albergar un gran número de taxones de hongos endófitos (Reis et al., 2016), y entre todos los taxones de hongos que pueden penetrar y colonizar a la planta, solo una pequeña proporción son capaces de causar patogénesis y enfermedad (González & Tello, 2011). Por ejemplo, González y Tello (2011) detectaron 51 géneros de hongos en plantas sintomáticas y asintomáticas de vid, y solo el 1.5% de los hongos endófitos fue caracterizado como patógeno, encontrándose asociado a diferentes enfermedades de la madera, tales como: la enfermedad de Petri (*Phaeomoniella clamydospora*, *Phaeoacremonium minimum* y *Pm. inflatipes*), la excoriosis (*Phomopsis viticola*), el decaimiento por *Botryosphaeria* (*Botryosphaeria* spp.) y la enfermedad del pie negro (*Cylindrocarpon destructans*).

La biología de los hongos de la madera de la vid es compleja. Varios estudios han demostrado que estos hongos pueden vivir de forma endófito en la planta, provocando infecciones asintomáticas (Halleen et al., 2003; Aroca et al., 2010), hasta que, bajo ciertas condiciones de estrés y manejo del cultivo, modifican su comportamiento dando lugar a la expresión de síntomas. El decaimiento de la vid joven asociado a las enfermedades de la madera es la principal causa biótica de mortalidad en nuevas plantaciones; sin embargo, existen varios factores abióticos y bióticos asociados al bajo rendimiento del cultivo tras la plantación (Stamp, 2001). En un estudio publicado por Sosnowski et al. (2011), se demostró que el estrés hídrico y la temperatura jugaban un papel importante en la manifestación de síntomas causados por *Eutypa lata* en vid adulta. Sin embargo, no existe información sobre el efecto que puedan tener factores de estrés abiótico, incluyendo un deficiente manejo del cultivo en los primeros años tras la plantación, en la incidencia de las enfermedades de la madera de la vid, y en particular, en el pie negro.

Se han dedicado muchos esfuerzos en investigar la función que tienen las comunidades bióticas en los mecanismos de resistencia de las plantas, y se ha

evidenciado que los procesos de infección de ciertos patógenos quedan reducidos por un efecto de interacción sinérgico endófito-planta (Schulz et al., 1999; Kernaghan et al., 2017). Esto sucede porque los organismos endófitos pueden interactuar con su huésped, mejorando su crecimiento (Waqas et al., 2014), su resistencia al estrés ambiental (Barrow et al., 2008), o su capacidad de resistir el ataque de hongos patógenos (Schulz, 2006). Este efecto hace que los patógenos pasen parte de su ciclo de vida como hongos comensales, hasta que llega un momento de debilidad de la planta y es entonces cuando actúan como patógenos. Es probable que en este TFM se hayan producido estas interacciones, ya que ninguna de las plantas analizadas presentó síntomas de la enfermedad del pie negro al cual está asociado la especie fúngica *D. torresensis*.

En este trabajo también se han obtenido aislados de *D. torresensis* de suelo y malas hierbas en las distintas parcelas estudiadas, tal como ha sido citado previamente en campos de viveros en España (Agustí-Brisach et al., 2011; Berlanas et al. 2017), Italia (Carlucci et al., 2017) y Portugal (Reis et al., 2013). Los hongos asociados al pie negro se caracterizan por ser habitantes comunes del suelo y, en ausencia del huésped, logran vivir largos periodos de tiempo debido a la producción de estructuras de resistencia, denominadas clamidosporas (Chaverri et al., 2011). Este hecho indica que el inóculo fúngico podría persistir durante un largo periodo de tiempo en el suelo hasta que se inicie el proceso de infección en la planta. No obstante, estos hongos también tienen la capacidad de vivir de forma alternativa en malas hierbas, tal como ha sido señalado por Agustí-Brisach et al. (2011), donde lograron aislar "*C. macrodidymum*" (sinónimo *D. macrodidyma*) de 16 familias de malas hierbas en distintos campos de vid en España. En este TFM, se obtuvieron cuatro aislados pertenecientes a dos familias de malas hierbas: *Caryophyllaceae* y *Brassicaceae*, esta última familia se mostró como susceptible a la colonización por hongos asociados al pie negro en el estudio publicado por Agustí-Brisach et al. (2011). Estos resultados muestran la necesidad de investigar en un futuro el papel real de las malas hierbas y otros huéspedes secundarios en la epidemiología del pie negro de la vid.

Este trabajo es el primero que estudia la diversidad poblacional de la especie fúngica *D. torresensis*. Otras investigaciones previas han estudiado la diversidad de otras especies asociadas al pie negro, tales como “*C. liriodendri*” (Alaniz et al., 2009; Pathrose et al., 2014), “*C. macrodidymum*” (Alaniz et al., 2009), *Dactylonectria pauciseptata* (Sheng et al., 2018) y especies del género *Ilyonectria* y “*Cylindrocarpon*” (Reis et al., 2013). Los métodos moleculares que generan información en polimorfismos del DNA se consideran actualmente como las mejores herramientas para estudiar la diversidad genética (Blanco et al., 2011). Hasta la fecha, se han utilizado varias técnicas moleculares para estudiar la diversidad genética en hongos asociados al pie negro, entre las que se incluyen RAPD (ampliación aleatoria del DNA polimórfico) (Reis et al., 2013), ISSR (*inter simple sequence repeat*, por sus siglas en inglés) (Alaniz et al., 2009), UP-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con cebadores universales) (Pathrose et al., 2014) y secuenciación de múltiples genes (de rRNA, β -tubulina, factor de elongación de traducción 1- α , histona H3) (Cabral et al., 2012; Sheng et al., 2018). En este TFM se ha utilizado la secuenciación del gen de la histona, ya que permite distinguir con mejor precisión a *D. torresensis* de otras especies asociadas al pie negro (Cabral et al., 2012).

El estudio genético de las poblaciones de *D. torresensis* ha dado como resultado en 12 haplotipos diferentes, siendo el H1 el más abundante. Esto indica que este haplotipo ha sido conservado por selección natural debido a un mayor éxito reproductivo a través del tiempo (Holmström & Jensen., 2004). Este argumento es respaldado por el hecho de que las muestras se tomaron en diferentes años en los sitios de estudio (Mendavía en 2017 y Larraga en 2018), y en ambas parcelas es el haplotipo que más prevalece. Por otro lado, los hongos patógenos suelen ser oportunistas y su capacidad para obtener nutrientes de las plantas parece depender del resultado de diferentes procesos evolutivos (Karasov et al., 2014). Estos procesos suceden a través de las expansiones de las familias de genes que facilitan la infección de la planta (Gladieux et al., 2011). Por ello, los árboles evolutivos son de gran interés porque proporcionan una representación gráfica de las relaciones entre las poblaciones, y nos dan una visión más clara de las fuerzas evolutivas que pueden tener lugar en ciertas poblaciones de hongos. Los resultados obtenidos

en este estudio indican que la mayor parte de los haplotipos encontrados en este TFM estaban relacionado por una secuencia de origen, el H2, que coincide con la secuencia de referencia previamente publicada (Cabral et al., 2012; Carlucci et al., 2017). Es probable, por tanto, que tal divergencia de las subpoblaciones se haya formado como consecuencia de un número limitado de mutaciones y de compensaciones en la adaptación de los fitopatógenos en las plantas (Gladieux et al., 2011).

Los estudios realizados en vid y otras especies leñosas postulan que las especies vegetales pueden influir en la composición de las comunidades microbianas que habitan la rizosfera (Zarraonaindia et al., 2015; Poli et al., 2016). La selección de la microbiota por parte de las raíces y, en particular, de los organismos considerados patógenos, son consecuencia de un componente genético de especialización de las plantas, lo cual permite que ciertas comunidades microbianas con genotipos concretos pasen a formar parte de su biota (Brown & Tellier, 2011). Una estrategia evolutiva que adoptan los patógenos de las plantas es la mutación frecuente, ya que les permite: (i) evitar ser detectados dentro de los huéspedes existentes, (ii) adaptarse a nuevos huéspedes, (iii) expresar ciertos mecanismos de resistencia contra el ataque de los demás miembros de la comunidad biótica de la planta (Karasov et al., 2014). Sin embargo, en cuanto a la vid, sería necesario seguir investigando el efecto que puede llegar a tener la microbiota del suelo en la selección de portainjerto, ya que estas variaciones también pueden dar lugar a un aumento sistemático de la virulencia de los patógenos con el tiempo (Kasarov et al., 2014). Por ejemplo, Alaniz et al (2010) evaluó una gran variedad de portainjertos de vid comúnmente usados en España, y comprobó que el portainjerto 110 Richter era el más susceptible al ataque de patógenos asociados al pie negro. Por otro lado, Alaniz et al., (2009) demostraron que la capacidad de virulencia de los hongos asociados al pie negro estaba vinculada a ciertos genotipos o grupos genéticos concretos, que pueden ser de la misma o de diferente especie. Sin embargo, en este TFM no se ha podido comprobar el vínculo que pueden dar lugar los diferentes haplotipos encontrados con la capacidad de virulencia en la planta, aunque eso no se descarta en estudios posteriores.

El árbol filogenético también mostró que los aislados obtenidos de plantas se relacionaron estrechamente con los procedentes de suelo y de malas hierbas (Fig 2). Del mismo modo, los haplotipos formaron grupos relacionados entre ellos, con un clado más numeroso que integraba la mayoría de las secuencias. La mayor diversidad haplotípica se presentó en las plantas asintomáticas, aunque esto puede deberse al mayor número de aislados estudiados en comparación con el resto de los huéspedes.

En este TFM se compararon las poblaciones de *D. torresensis* de las dos parcelas (Larraga y Mendavia), y se observó que ambas parcelas tienen una distribución similar entre el número de aislados con un mismo haplotipo, y que el haplotipo más abundante es el mismo (H1) en ambos campos. Por otro lado, la parcela de Mendavia presentó mayor diversidad haplotípica, pero la mayor parte de los genotipos encontrados solo estaban compuestos por un aislado. Cabe destacar que, para estudios de reproducción clonal, se necesitaría contar con una mayor población para tener en cuenta dicha diversidad haplotípica. Además, la presencia de más de un genotipo dentro de ambas parcelas sugiere la introducción frecuente de nuevos genotipos o la recombinación de genotipos ya existentes, ya que los aislados genéticamente distintos en las parcelas de Larraga y Mendavia se distribuyeron aleatoriamente entre los diferentes clados. Un estudio similar fue presentado por Pathrose et al. (2014), donde mostraron la presencia de más de un genotipo dentro de un viñedo y, sugieren que la diversidad genética está vinculada al uso de material de propagación (portainjertos, semillas y plantas). Por otro lado, distintos factores pueden afectar a las poblaciones de hongos, tales como las prácticas de cultivo, el historial de siembra o el tipo de suelo (Gordon et al., 1992). Es probable que ambas parcelas estén sometidas a un similar manejo de cultivo, porque la distribución, o variedad de haplotipos entre las poblaciones de *D. torresensis* fueron similares, aunque los dos campos se encontraban separados aproximadamente 35 Km.

Los resultados obtenidos en este TFM podrán contribuir a un manejo más eficiente de la enfermedad del pie negro de la vid, al desarrollo de portainjertos resistentes y ayudará a tomar decisiones más rápidas en las diferentes estrategias del control de patógenos en el viñedo.

6.- CONCLUSIONES

- La especie fúngica asociada al pie negro, *D. torresensis*, tiene la capacidad de vivir de forma endófito en la planta de vid, sin causar síntomas visibles de la enfermedad del pie negro.
- La presencia de *D. torresensis* en muestras de suelo y malas hierbas, constituye un factor crítico, ya que pueden servir como fuentes potenciales de inóculo para la infección de la planta de vid.
- La secuenciación del gen de la histona en la especie *D. torresensis*, ha proporcionado una visión de la diversidad haplotípica en las poblaciones del hongo, con 12 haplotipos detectados de todos los aislados obtenidos en este estudio.
- El análisis de la red filogenética presentó dos clados, con aislados (de planta, suelo y malas hierbas) estrechamente relacionados, al igual que la relación de los haplotipos encontrados en las parcelas de Mendavia y Larraga.
- El árbol filogenético reveló que la mayoría de los haplotipos estaban relacionado con una secuencia de origen, H2.
- El H1 es la secuencia que más prevalece en las dos parcelas, lo que indica que probablemente dicho haplotipo pueda estar mejor adaptado para infectar la planta.

7.- BIBLIOGRAFÍA

- Abreo, E., Martínez, S., Bettucci, L. & Lupo, S. (2010). Morphological and molecular characterisation of *Campylocarpon* and *Cylindrocarpon* spp. associated with black foot disease of grapevines in Uruguay. *Australasian Plant Pathology*, 39, 446-452.
- Agustí-Brisach C. y Armengol J. (2014). El pie negro de la vid: agentes causales, epidemiología y estrategias de control. *Phytoma España*, 260, 32-35.
- Agustí-Brisach, C. & Armengol, J. (2013). Black-foot disease of grapevine: an update on taxonomy, epidemiology and management strategies. *Phytopathologia mediterránea*, 52, 245-261.
- Agustí-Brisach, C., Gramaje, D., García-Jiménez, J. & Armengol, J. (2013). Detection of black-foot and Petri disease pathogens in soils of grapevine nurseries and vineyards using bait plants. *Plant soil*, 364, 5-13.
- Agustí-Brisach, C., Gramaje, D., León, M., García-Jiménez, J. & Armengol, J. (2011). Evaluation of vineyard weeds as potential hosts of black-foot and petri disease pathogens. *Plant Disease*, 95, 803–810.
- Agustí-Brisach, C., Mostert L and Armengol, J. (2014). Detection and quantification of *Ilyonectria* spp. associated with black-foot disease of grapevine in nursery soils using multiplex nested PCR and quantitative PCR. *Plant Pathology*, 63, 316-322.
- Aizpuru, I., Aseginolaza, C., Uribe-Echeberría, P.M., Urrutia, P. & Zorrakin, I. (1999). *Claves Ilustradas de la Flora del País Vasco y Territorios Limítrofes*. Victoria-Gasteinz.
- Alaniz, S., Armengol, J., León, M. & García-Jiménez, G. (2009). Analysis of genetic and virulence diversity of *Cylindrocarpon liriodendri* and *C. macrodidymum* associated with black foot disease of grapevine. *Mycological Research* 113, 16-23.
- Alaniz, S., García-Jiménez, J., Abad-Campos, P. & Armengol, J. (2010). Susceptibility of grapevine rootstocks to *Cylindrocarpon liriodendri* and *C. macrodidymum*. *Scientia Horticulturae*, 125, 305-308.
- Aroca, A., Gramaje, D., Armengol, J., García-Jiménez, J. & Raposo, R. (2010). Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence

of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 126, 165-174.

- Barrow, J. R., L, M. E., Reyes-Vera, I. & Havstad, K.M. (2008) Do symbiotic microbes have a role in regulating plant performance and response to stress?. *Communicative & Integrative Biology*, 1, 69-73.
- Berlanas, C., Andrés-Sodupe, M., López-Manzanares, B., Maldonado-González, M. M. & Gramaje, D. (2018) Effect of white mustard cover crop residue, soil chemical fumigation and *Trichoderma* spp. root treatment on black-foot disease control in grapevine. *Pest Management Science* <https://doi.org/10.1002/ps.5078>.
- Berlanas, C., López-Manzanares, B. & Gramaje, D. (2017). Estimation of viable propagules of black-foot disease pathogens in grapevine cultivated soils and their relation to production systems and soil properties. *Plant soil*, 417, 467-479.
- Bertsch, C., Ramírez-Suero, M., Magnin-Roberth, M., Larignon, P., Chong, J., Abou-Mansour, E., Spagnolo, A., Clément, C. & Fontaine. (2013). Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology*, 62, 243-265.
- Blanco, M. J., Romero, M.C & Díaz, R.M.J. (2011). Estimación de la diversidad genética en hongos fitopatógenos mediante herramientas moleculares. *Herramientas biotecnológicas en fitopatologías*, España, aedos, s.a.
- Booth, C. (1966). The genus *Cylindrocarpon*. *Mycological Papers*, 104, 1-56.
- Brown, J.K. y Tellier, M. (2011). Plant-parasite coevolution: Bridging the gap between genetics and ecology. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 345–367.
- Cabral, A., Rego, C., Nascimento, T., Oliveira, H., Groenewald, J. Z. & Crous, P. W. (2012). Multi-gene analysis and morphology reveal novel *Ilyonectria* species associated with black foot disease of grapevines. *Fungal Biology*, 116, 62-80.
- Carlucci, A., Lops, F., Mostert, L., Hallen, F. & Raimondo M. L. (2017). Occurrence fungi causing black foot on Young grapevines and nursery rootstock plants in Italy. *Phytopathology Mediterranean*, 56, 10-39.

- Chaverri, P., Salgado, C., Hirooka, Y., Rossman, A.Y. & Samuels, G.J. (2011). Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae., Hypocreales., Ascomycota). and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. *Studies in Mycology*. 68, 57–78.
- Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Risede, J.M., Hywel-Jones, N.L. (2004) *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. *Studies in Mycology* 50, 415-429.
- Fontaine, F. & Armengol, J. (2014). Sustainable control of grapevine trunk diseases. *Phytopathologia Mediterranea*, 53, 584–585.
- Fourie, P. H., & Halleen, F. (2004). Proactive control of Petri disease of grapevine through treatment of propagation material. *Plant Disease* 88, 1241-1245.
- Fourie, P. H., & Halleen, F. (2006). Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 116, 255-265.
- Gladieux, P., Byrnes, E. J., Aguilera, G., Fisher, M., Heitman, J. & Giraud, T. (2011). Epidemiology and Evolution of Fungal Pathogens in Plants and Animals. *Genetic and Evolution of infectious Diseases*, 59-132.
- González, V. & Tello, M. (2011). The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Diversity*, 47, 29-42.
- Gordon, T. R., Okamoto, D., Milgroom, M.G. (1992). The structure and interrelationship of fungal populations in native and cultivated soils. *Molecular Ecology*, 1, 241–249.
- Gramaje, D. & Armengol, J. (2011). Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. *Plant Disease*, 95, 1040–1055.
- Gramaje, D. (2018). Managing Grapevine Trunk Disease With Respect to Etiology and Epidemiology: Current Strategies and Future Prospects. *Plant Disease*, 102, 1-28.
- Grasso S. 1984. Infezioni di *Fusarium oxysporum* e di *Cylindrocarpon destructans* associate a una moria di giovani piante di vite in Sicilia. *Informatore Fitopatologico* 1, 59-63.

- Grasso, S. & Magnano Di San Lio, G. (1975). Infezioni di *Cylindrocarpon obtusisporium* su piante di vite in Sicilia. *Vitis*, 14, 36-39.
- Halleen, F., Schroers, H. J., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2004). Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. Associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp.). *Studies in Mycology*, 50, 431-455.
- Halleen, F., Fourie, P. H., & Crous, P. W. (2006). A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 45, S55-S67.
- Halleen, F., Crous, P.W. & Petrini, O. (2003). Fungi associated with healthy grapevine cutting in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vine. *Australasian Plant Pathology*, 47-52.
- Hamelin, R. C., Bérubé, P., Gignac, M. & Bourassa, M. (1996). Identification of root rot in nursery seedling by nested multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4026-4031.
- Hofstetter, V., Buyck, B., Croll, D., Viret, O., Couloux, A. & Gindro, K. (2012). What if esca disease of grapevine were not a fungal disease?. *Fungal Diversity*, 54, 51-67.
- Holmström K. & Jensen H. J. (2004). Who runs fastest in an adaptive landscape: sexual versus asexual reproduction. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 337, 185-195.
- Kasarov, T. L., Horton, M. W. & Bergelson, J. (2014). Genomic variability as a driver of plant-pathogen coevolution?. *Current Opinion in Plant Biology*, 18, 24-30.
- Kernaghan, G., Mayerhofer, M. & Griffin, A. (2017). Fungal endophytes of wild and hybrid *Vitis* leaves and their potential for vineyard biocontrol. *Canadian Journal of Microbiology*, 63, 583-595.
- Lombard, L., Van der Merwe, N. A., Groenewald, J. Z. & Crous P.W. (2014). Lineages in *Nectriaceae*: re-evaluating the generic status of *Ilyonectria* and allied genera. *Phytopathologia Mediterranea* 53, 515–532.

- Lorch, W. (2014). Fatal wood disease affects 12 percent of French vineyards. Retrieved 15 June 2018 from <https://www.wine-searcher.com/m/2014/10/fatal-wood-diseases-affect-12-percent-of-french-vineyards>.
- Luque, J., Elena, G., Armengol, J. & Legorburu, J. (2014). Las enfermedades de la madera de la vid: reflexiones sobre un panorama complejo. *Phytoma España* 260, 18-24.
- MAGRAMA (2017). Anuario de estadística agroalimentaria. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Web: <http://www.magrama.gob.es/>
- Mahfuzur, R. & Punja, Z. K. (2005). Factors influencing development of root rot on ginseng caused by *Cylindrocarpon destructans*. *Phytopathology*, 95, 1381-1390.
- Maluta DR. & Larignon P. (1991). Pied-noir: mieux vaut prévenir. *Viticulture*, 11, 71-72.
- Mora-Sala, M., Cabral, A., León, M., Agustí-Brisach, C., Armengol, J. & Abad-Campos, P. (2018). Survey, Identification and Characterization of cylindrocarpon like asexual morphs in Spanish forest nurseries. *Plant disease*, paper accepted.
- Pathrose, B., Jones, E.E., Jasper V. & Ridgway, H.J. (2014). High genotypic and virulence diversity in *Ilyonectria liriodendri* isolates associated with black foot disease in New Zealand vineyards. *Plant Pathology*, 63, 613-624.
- Poli, A., Lazzari, A., Prigione, V., Voyron, S., Spadaro, D. & Varese, G.C. (2016). Influence of plant genotype on the cultivable fungi associated to tomato rhizosphere and roots in different soils. *Fungal Biology*, 862-872.
- Reeleder, R. D. & Brammal, R. A. (1994). Pathogenicity of *Pythium* species, *Cylindrocarpon destructans*, and *Rhizoctonia solani* to ginseng seedling in Ontario. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16, 311-316.
- Reeleder, R. D. (2003). Fungal Plant Pathogens and Soil Biodiversity. *Canadian Journal of Soil Science*, 83, 331-336.
- Rego C., Oliveira H., Carvalho A. & Phillips A. (2000). Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea*, 39, 76-79.

- Reis, P., Cabral, A., Nascimento, T., Oliveira, H. & Rego, C. (2013). Diversity of *Ilyonectria* species in a young vineyard affected by black foot disease. *Phytopathology Mediterranean*, 52, 335-346.
- Schulz, B. (2006). Mutualistic Interactions with Fungal Root Endophytes. *Soil Biology*, 9, 261-279.
- Schulz, B., Anne-Katrin, R., Ulrike, D., Hans-Jürgen, A. & Strack, D. (1999). The endophyte-host interaction: a balanced antagonism?. *Mycological Research*, 103, 1275-1283.
- Sheng, Y., Jones, E.E. & Ridgway, H.J. (2018). Genetic diversity in *Dactylonectria pauciseptata* associated with black foot disease in New Zealand. *New Zealand Plant Protection*, 71.
- Sosnowski, M.R., Luque, J., Loschiavo, A.P., Martos, S., García-Figueroles, F., Wicks, T.W. & Scott, E.S. 2011. Studies on the effect of water and temperature stress on grapevines inoculated with *Eutypa lata*. *Phytopathologia Mediterranea* 50, 127-138.
- Stamp, J.A. (2001). The contribution of imperfections in nursery stock to the decline of young vines in California. *Phytopathology Mediterranean*, 40, 369-375.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G. & Nei, M. (2011) MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731–2739.
- Waqas, M., Khan, L. A. & In-Jung L. (2014). Bioactive chemical constituents produced by endophytes and effects on rice plant growth. *Journal of Plant Interactions*, 9, 478-487
- Zarraonaindia, I., Owens, S.M., Weisenborn, P., West, K., Hampton-Marcell, J., Lax, S., Bokulich, N.A., Mills, D.A., Martin, G., Taghavi, S., van der Lelie, D. y Gilbert, J.A. (2015). The soil microbiome influences grapevine associated microbiota. *mBio*, 6(2), e02527–14.

ANEXOS

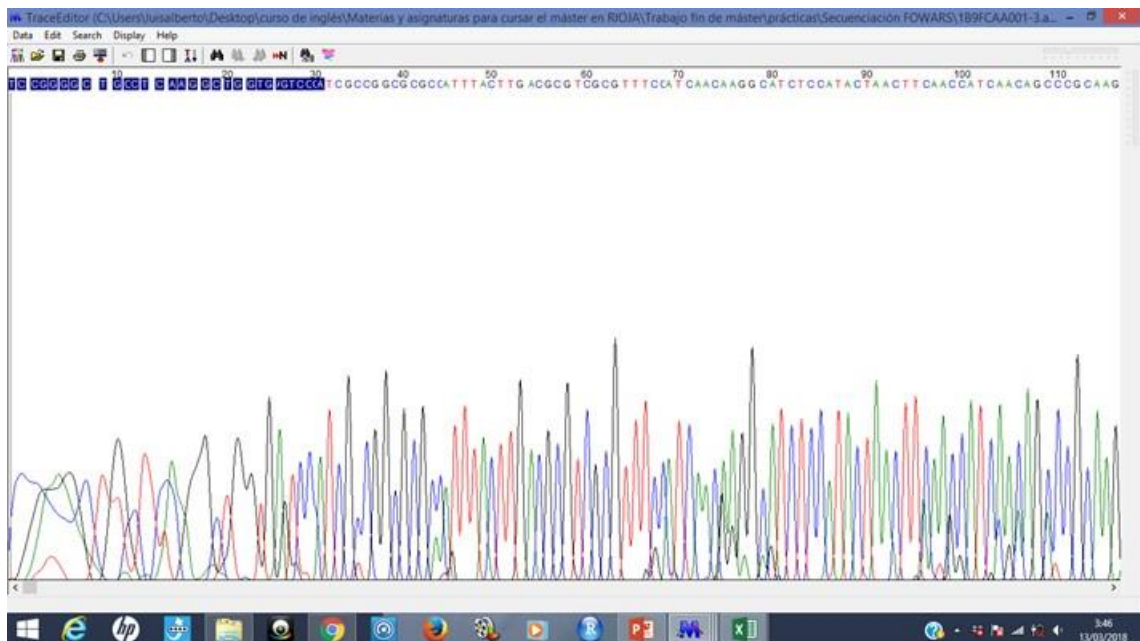


Figura 1. Proceso de edición de secuencia: eliminando extremos y corrigiendo errores en cada una de las secuencias utilizadas en este estudio.

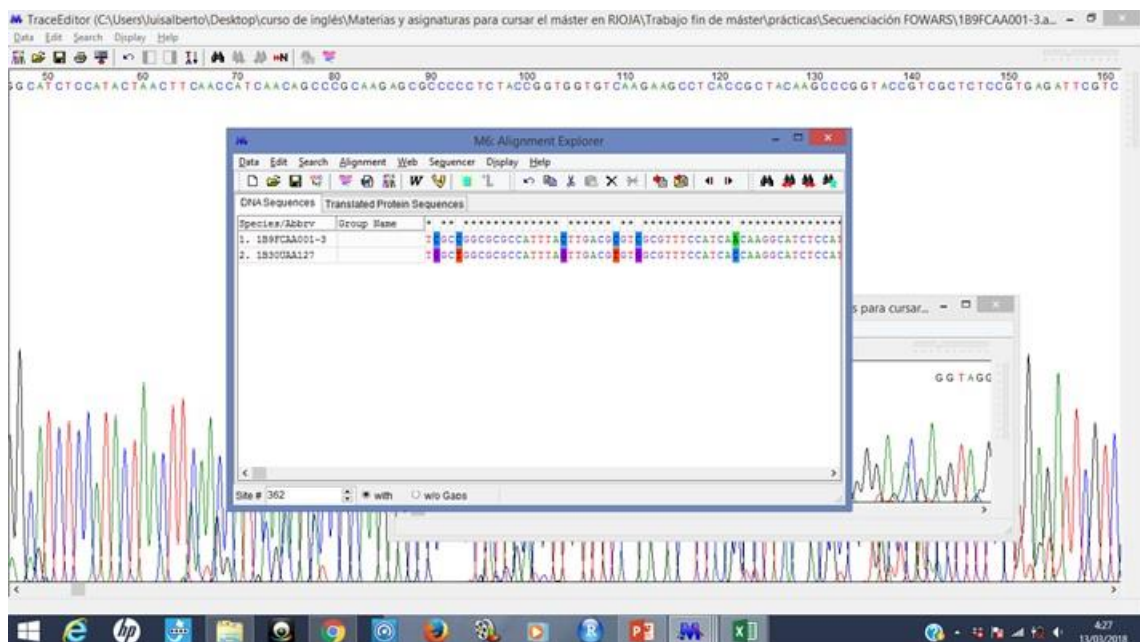


Figura 2. Edición y consenso de las secuencias (directo y reversa) de cada aislado

```
Consenso_TOT.txt: Bloc de notas
Archivo Edición Formato Ver Ayuda
>BV-433_consensoHIST
ATCGCGGGCGGCATTACTTGACGCGTCGCGTTTCCATCAACAATGCATCTCCATACTAAGCTCAACAGCCCGAAGAGCGCCCCCTCTACTGGTGGTCAAGAAGCTCACCGCTACAAGCG
>BV-441_consensoHIST
CAAGGCATCTCCATAGGAACCTGAACCATCAACAGCCCGAAGAGCGCCCCCTCTACCGTGGTGTCAAGAAGCTCACCGCTACAAGCCGGTACCGTCTCCGTGAGATTCTGCTGTACCAGAAGTCG
>BV-422_ConsensoHIST
TTGACGTGTGGCGTTTCCATCAACAATGCATCTCCATACTAAGCTCAACCATCAACAGCCCGAAGAGCGCCCCCTCTACCGTGGTGTCAAGAAGCTCACCGCTACAAGCCGGTACCGTCTCCGTG
>BV-432
TCGCCGGCGGCCATTACTTGACGCGTCGCGTTTCCATCAACAAGGCATCTCCATACTAAGCTCAACAGCCCGAAGAGCGCCCCCTCTACCGTGGTGTCAAGAAGCTCACCGCTACAAGCG
>BV-436_consensoHIST
CGCGCGGCATTACTTGACGCGTCGCGTTTCCATCAACAAGGCATCTCCATACTAAGCTCAACAGCCCGAAGAGCGCCCCCTCTACCGTGGTGTCAAGAAGCTCACCGCTACAAGCCGGTAC
>BV-442_consensoHIST
TCGCCGGCGGCCATTACTTGACGCGTCGCGTTTCCATCAACAATGCATCTCCATACTAAGCTCAACCATCAACAGCCCGAAGAGCGCCCCCTCTACTGGTGGTGTCAAGAAGCTCACCGCTACAAGCG
>BV-446_consensoHIST
CAATGCATCTCCATACTAAGCTCAACCATCAACAGCCCGAAGAGCGCCCCCTCTACCGTGGTGTCAAGAAGCTCACCGCTACAAGCCGGTACCGTCTCCGTGAGATTCTGCTGTACCAGAAGTCG
>BV-447_consensoHIST
CAATGCATCTCCATACTAAGCTCAACCATCAACAGCCCGAAGAGCGCCCCCTCTACCGTGGTGTCAAGAAGCTCACCGCTACAAGCCGGTACCGTCTCCGTGAGATTCTGCTGTACCAGAAGTCG
>BV-450_consensoHIST
ACTTGACGCATCGCGTTTCCATCAACAAGGCATCTCCATACTAAGCTCAACCATCAACAGCCCGAAGAGCGCCCCCTCTACCGTGGTGTCAAGAAGCTCACCGCTACAAGCCGGTACCGTCTCCG
>BV-454_consensoHIST
GCGTTTCCATCAACAAGGCATCTCCATACTAAGCTCAACCATCAACAGCCCGAAGAGCGCCCCCTCTACCGTGGTGTCAAGAAGCTCACCGCTACAAGCCGGTACCGTCTCCGTGAGATTCTGCTG
>BV-455_consensoHIST
CATTACTTGACGCGTCGCGTTTCCATCAACAAGGCATCTCCATACTAAGCTCAACCATCAACAGCCCGAAGAGCGCCCCCTCTACCGTGGTGTCAAGAAGCTCACCGCTACAAGCCGGTACCGTCTCCG
>BV-458_consensoHIST
GCGCGCGGCATTACTTGACGCGTCGCGTTTCCATCAACAAGGCATCTCCATACTAAGCTCAACCATCAACAGCCCGAAGAGCGCCCCCTCTACCGTGGTGTCAAGAAGCTCACCGCTACAAGCCGG
>BV-459
ATGCATCTCCATACTAAGCTCAACCATCAACAGCCCGAAGAGCGCCCCCTCTACTGGTGGTGTCAAGAAGCTCACCGCTACAAGCCGGTACCGTCTCCGTGAGATTCTGCTGTACCAGAAGTCGAG
>BV-460_consensoHIST
CGCATTTACTTGACGCGTCGCGTTTCCATCAACAAGGCATCTCCATACTAAGCTCAACCATCAACAGCCCGAAGAGCGCCCCCTGTACCGTGGTGTCAAGAAGCTCACCGCTACAAGCCGGTACCGTCTCCG
>BV-461_consensoHIST
GGCGCGCATTTACTTGACGCGTCGCGTTTCCATCAACAATGCATCTCCATACTAAGCTCAACCATCAACAGCCCGAAGAGCGCCCCCTCTACTGGTGGTGTCAAGAAGCTCACCGCTACAAGCCGGTAC
>BV-466_consensoHIST
ACTTGACGCGTCGCGTTTCCATCAACAAGGCATCTCCATACTAAGCTCAACCATCAACAGCCCGAAGAGCGCCCCCTCTACCGTGGTGTCAAGAAGCTCACCGCTACAAGCCGGTACCGTCTCCG
>BV-467_consensoHIST
AACCATCAACAGCCCGAAGAGCGCCCCCTCTACCGTGGTGTCAAGAAGCTCACCGCTACAAGCCGGTACCGTCTCCGTGAGATTCTGCTGTACCAGAAGTCGACCGAGCTCTCATCCGCAAGCT
>BV-468consensoHIST
GCGTTTCCATCAACAAGGCATCTCCATACTAAGCTCAACCATCAACAGCCCGAAGAGCGCCCCCTCTACCGTGGTGTCAAGAAGCTCACCGCTACAAGCCGGTACCGTCTCCGTGAGATTCTGCTG
```

Figura 3. Consolidado de las secuencias en formato fasta y, almacenado en un único archivo de texto.